

40/088907  
PCT/JP 00/06566  
20.11.00

EKV

3P00/6566  
日本国特許庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 04 DEC 2000

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

2000年 7月10日

出願番号

Application Number:

特願2000-208788

出願人

Applicant(s):

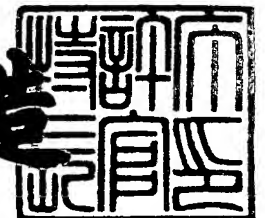
出光興産株式会社

PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年10月 6日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3083013

【書類名】 特許願  
 【整理番号】 IK6200  
 【提出日】 平成12年 7月10日  
 【あて先】 特許庁長官殿  
 【国際特許分類】 B09C 1/00  
 C12N 1/00

---

【発明の名称】 難分解性芳香族化合物の分解方法

【請求項の数】 9

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県袖ヶ浦市上泉 1 2 8 0 番地

【氏名】 川端 孝博

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県袖ヶ浦市上泉 1 2 8 0 番地

【氏名】 宮本 秀夫

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県袖ヶ浦市上泉 1 2 8 0 番地

【氏名】 鈴木 源士

【特許出願人】

【識別番号】 000183646

【氏名又は名称】 出光興産株式会社

【代理人】

【識別番号】 100078732

【弁理士】

【氏名又は名称】 大谷 保

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成11年特許願第270392号

【出願日】 平成11年 9月24日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 003137

特 2 0 0 0 - 2 0 8 7 8 8

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0000937

【プルーフの要否】 要

---

【書類名】 明細書

【発明の名称】 難分解性芳香族化合物の分解方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 炭素数が6以上の難分解性芳香族化合物を分解するにあたり、該難分解性芳香族化合物と、ラッカーゼおよび／またはラッカーゼを生産する微生物とを接触させることを特徴とする難分解性芳香族化合物の分解方法。

【請求項2】 炭素数が6以上の難分解性芳香族化合物が、ダイオキシン類、コプラナPCB類、ビスフェノール類、アルキルフェノール類、ハロゲン化フェノール類及びフタル酸エステル類から選ばれる少なくとも1種である請求項1記載の分解方法。

【請求項3】 塩素原子を1個以上有するダイオキシン類またはコプラナPCB類を分解するにあたり、該ダイオキシン類またはコプラナPCB類と、ラッカーゼおよび／またはラッカーゼを生産する微生物を、水または土壌中で接触させることを特徴とするダイオキシン類の分解方法。

【請求項4】 ラッカーゼが、シゾフィラム (*Schizophyllum*) 属、プレウロタス (*Pleurotus*) 属、トラメテス (*Trametes*) 属、レンチナス (*Lentinus*) 属、リゾクトニア (*Rhizoctonia*) 属、フナリア (*Funalia*) 属、フィクノポラス (*Pycnoporus*) 属、メルリウス (*Merulius*) 属、ミセリオプトラ (*Myceliophthora*) 属、コプリヌス (*Coprinus*) 属、アガリクス (*Agaricus*) 属、フォリオタ (*Pholiota*) 属、フラムリナ (*Flammulina*) 属、ガノデルマ (*Ganoderma*) 属、ダエダレオプシス (*Daedaleopsis*) 属、ファボラス (*Favolus*) 属、リオフィラム (*Lyophyllum*) 属またはオーリクラリア (*Auricularia*) 属に属する微生物が生産したラッカーゼを分離したものである請求項1記載の分解方法。

【請求項5】 ラッカーゼを生産する微生物が、シゾフィラム (*Schizophyllum*) 属、プレウロタス (*Pleurotus*) 属、トラメテス (*Trametes*) 属、レンチナス (*Lentinus*) 属、リゾクトニア (*R*

hizoctonia) 属、フナリア (Funalia) 属、フィクノポラス (Pycnoporus) 属、メルリウス (Merulius) 属、ミセリオプトラ (Myceliophthora) 属、コプリヌス (Coprinus) 属、アガリクス (Agaricus) 属、フォリオタ (Pholiota) 属、フラムリナ (Flammulina) 属、ガノデルマ (Ganoderma) 属、ダエダレオプシス (Daedaleopsis) 属、ファボラス (Favolus)

属、リオフィラム (Lyophyllum) 属またはオーリクラリア (Auricularia) 属に属する微生物である請求項 1 記載の分解方法。

【請求項 6】 炭素数が 6 以上の難分解性芳香族化合物と、ラッカーゼおよび／またはラッカーゼを生産する微生物とを、pH が 3～11 の水または土壌中において接触させることを特徴とする請求項 1～5 のいずれかに記載の分解方法。

【請求項 7】 ラッカーゼおよび／またはラッカーゼを生産する微生物を含有する組成物からなる、炭素数が 6 以上の難分解性芳香族化合物の分解剤。

【請求項 8】 組成物が更にメディエーターを含有する請求項 7 記載の分解剤。

【請求項 9】 炭素数が 6 以上の難分解性芳香族化合物が、ダイオキシン類、コプラナ PCB 類、ビスフェノール類、アルキルフェノール類、ハロゲン化フェノール類及びフタル酸エステル類から選ばれる少なくとも 1 種である請求項 7 または 8 に記載の分解剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、都市ゴミや産業廃棄物の焼却設備などにおいて排出される焼却灰や排気、排水（排液）さらにこの焼却灰の飛散に伴って汚染された土壌や汚染水などに含まれるダイオキシン類、コプラナ PCB 類、ビスフェノール類、アルキルフェノール類、ハロゲン化フェノール類、フタル酸エステル類などの有害な難分解性物質を分解して無害化する方法に関する。

【0002】

## 【従来の技術】

人体に有害な物質としてよく知られているダイオキシン類等の難分解性物質は、都市ごみや産業廃棄物の焼却設備や様々な燃焼設備、機器類などから自然界に排出され、また、化学物質の製造工程においては環境に悪影響を及ぼす種々の有機化合物が排出され、大きな社会問題となっている。

例えば、ダイオキシン類等には、種々の化学構造を有するものがあり、多塩素化ジベンゾ-p-ダイオキシン類や多塩素化ジベンゾフラン、コプラナPCB類などが知られている。これらの中でも、最も代表的な化合物は、2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾ-p-ジオキシンである。

これらダイオキシン類等は、生物により分解され難いことから、多くの生物の体内に吸収され、食物連鎖により、最終的には動物体内に蓄積されて濃縮され、催奇形成性を示すことが知られている。

そこで、これらダイオキシン類の発生を抑制する方法が検討され、提案されており、例えば、自動車や焼却炉などからの排出ガスを二段階で高温燃焼する方法が提案されている。しかしながら、このような方法においてもダイオキシン類の発生を十分に抑制できるまでには至っていない。そして、大気中に放出されたダイオキシン類は、雨水や雪とともに地上に降りて土壤に蓄積される。このように、自然界に放置されたダイオキシン類を無害化するための有効な手段は見出されていない。

また、フェノール類については、活性炭等による吸着分離、活性汚泥による分解が行われているが、ハロゲン化フェノール類、アルキルフェノール類、ビスフェノール類、更にはフタル酸エステル類などは、その化学構造から生物的に分解されにくく、環境中に蓄積されやすいという問題があり、これらの化合物は、食物連鎖により生物濃縮され、人や環境生物に種々の被害をもたらしている。

## 【0003】

近年、ダイオキシン類等の自然界では分解されがたい化学物質を微生物により分解する方法に関する研究がなされ、ある種の微生物が産生するリグニン分解酵素がダイオキシン類を分解することが報告されている [BIO INDUSTRY VOL.15 NO.2 P5-13(1998) : 化学 VOL.52 NO.10 P24-25(1997)]。

さらに、上記報告においては、微生物が産生するリグニン分解酵素によるダイオキシン類の分解に関し、担子菌類に属する木材腐朽菌のうち白色腐朽菌が産生するリグニン分解酵素が、ダイオキシン類など様々な化学物質を分解できることが示されている。この白色腐朽菌は、木材中の主成分である多糖類のセルロースやヘミセルロースを栄養源として生育し、これをエネルギーとして木材中のリグニンを分解する旨が述べられている。したがって、この白色腐朽菌が棲息する森林地帯においては、大気中から雨水などとともに地上に降り注いだダイオキシン類は、白色腐朽菌の産生するリグニン分解酵素によって分解されやすいと考えられる。

ところで、この白色腐朽菌によるリグニン分解酵素の生産は、培地の組成、特に窒素源の含有割合や、白色腐朽菌の増殖条件に左右される。したがって、白色腐朽菌の棲息条件によっては全くリグニン分解酵素を生産しないこともあり、安定性に欠けるという問題がある。

また、この白色腐朽菌が棲息する森林地帯を除く多くの地域においては、ダイオキシン類のさらなる蓄積が進行して、生物への影響が深刻な問題となるおそれ大きい。このような状況から、焼却設備などから自然界に排出されるダイオキシン類などを含む排気や排水（排液）、焼却灰、さらにこれらによって汚染された土壌などに蓄積されたダイオキシン類やフェノール類、フタル酸エステル類等を分解して無害化するための技術の開発が強く要望されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、焼却設備、製造設備などから自然界に排出されるダイオキシン類、コプラナPCB類、ビスフェノール類、アルキルフェノール類、ハロゲン化フェノール類、フタル酸エステル類などの炭素数が6以上の難分解性芳香族化合物を含む排気や排水（廃液）、焼却灰、さらにこれらによって汚染された土壌などに蓄積された上記難分解性芳香族化合物を、安定性の高い酵素や安定した酵素生産性を有する微生物による分解によって無害化する方法を提供することを目的とするものである。

【0005】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、前記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、ラッカーゼまたはラッカーゼを生産する微生物が、上記ダイオキシン類等の難分解性芳香族化合物を分解することを見出し、これらの知見に基づいて本発明を完成させるに至った。すなわち、本発明の要旨は、以下のとおりである。

## 【0006】

(1) 炭素数が6以上の難分解性芳香族化合物を分解するにあたり、該難分解性芳香族化合物と、ラッカーゼおよび／またはラッカーゼを生産する微生物とを接触させることを特徴とする難分解性芳香族化合物の分解方法、

(2) 炭素数が6以上の難分解性芳香族化合物が、ダイオキシン類、コプラナPCB類、ビスフェノール類、アルキルフェノール類、ハロゲン化フェノール類及びフタル酸エステル類から選ばれる少なくとも1種である上記(1)記載の分解方法、

(3) 塩素原子を1個以上有するダイオキシン類またはコプラナPCB類を分解するにあたり、該ダイオキシン類またはコプラナPCB類と、ラッカーゼおよび／またはラッカーゼを生産する微生物を、水または土壌中で接触させることを特徴とするダイオキシン類の分解方法、

## 【0007】

(4) ラッカーゼが、シゾフィラム (*Schizophyllum*) 属、プレウロタス (*Pleurotus*) 属、トラメテス (*Trametes*) 属、レンチナス (*Lentinus*) 属、リゾクトニア (*Rhizoctonia*) 属、フナリア (*Funalia*) 属、フィクノポラス (*Pycnoporus*) 属、メルリウス (*Merulius*) 属、ミセリオプトラ (*Myceliophthora*) 属、コプリヌス (*Coprinus*) 属、アガリクス (*Agaricus*) 属、フォリオタ (*Pholiota*) 属、フラムリナ (*Flammulina*) 属、ガノデルマ (*Ganoderma*) 属、ダエダレオプシス (*Daedaleopsis*) 属、ファボラス (*Favolus*) 属、リオフィラム (*Lyophyllum*) 属またはオーリクラリア (*Auricularia*) 属に属する微生物が生産したラッカーゼを分離したものである上記(1)記載の分解方法、



## 【0008】

(5) ラッカーゼを生産する微生物が、シゾフィラム (*Schizophyllum*) 属、プレウロタス (*Pleurotus*) 属、トラメテス (*Trametes*) 属、レンチナス (*Lentinus*) 属、リゾクトニア (*Rhizoctonia*) 属、フナリア (*Funalia*) 属、フィクノポラス (*Pycnoporus*) 属、メルリウス (*Merulius*) 属、ミセリオプトラ (*Myceliophthora*) 属、コプリヌス (*Coprinus*) 属、アガリクス (*Agaricus*) 属、フォリオタ (*Pholiota*) 属、フラムリナ (*Flammulina*) 属、ガノデルマ (*Ganoderma*) 属、ダエダレオプシス (*Daedaleopsis*) 属、ファボラス (*Favolus*) 属、リオフィラム (*Lyophyllum*) 属またはオーリクラリア (*Auricularia*) 属に属する微生物である上記 (1) 記載の分解方法、

(6) 炭素数が6以上の難分解性芳香族化合物と、ラッカーゼおよび／またはラッカーゼを生産する微生物とを、pHが3～11の水または土壌中において接触させることを特徴とする上記 (1) ～ (5) のいずれかに記載の分解方法、

(7) ラッカーゼおよび／またはラッカーゼを生産する微生物を含有する組成物からなる、炭素数が6以上の難分解性芳香族化合物の分解剤、

(8) 組成物が更にメディエーターを含有する上記 (7) 記載の分解剤、及び

(9) 炭素数が6以上の難分解性芳香族化合物が、ダイオキシン類、コブラナP CB類、ビスフェノール類、アルキルフェノール類、ハロゲン化フェノール類及びフタル酸エステル類から選ばれる少なくとも1種である上記 (7) または (8) 記載の分解剤。

## 【0009】

## 【発明の実施の形態】

本発明の分解方法においては、炭素数が6以上の難分解性芳香族化合物と、ラッカーゼおよび／またはラッカーゼを生産する微生物とを接触させることによって、上記難分解性化合物を分解し、人体あるいは他の動物に対して毒性がないか、より危険性の低い化合物に転化させて、無害化を図るのである。

この場合、上記難分解性芳香族化合物を、その発生源からの直接的な排気や排

水（排液）、焼却灰、さらにこれらによって汚染された土壌より分離して処理することも可能ではあるが、その取扱いには危険性が伴うことから、排気や排水（排液）、焼却灰、汚染土壌そのものを処理するのが適切である。

## 【0010】

本発明において、炭素数が6以上の難分解性芳香族化合物としては、ダイオキシン類、コプラナPCB類、ビスフェノール類、アルキルフェノール類、ハロゲン化フェノール類、フタル酸エステル類等が挙げられる。

炭素数が6以上の難分解性芳香族化合物であるダイオキシン類は、塩素原子を1個以上有するダイオキシン類であり、ジベンゾー

-

ダイオキシンやジベンゾフランが有する2個のベンゼン環における水素原子が塩素原子により置換された化合物である。この塩素原子の置換数やベンゼン環における置換位置により多種多様な化合物が包含される。

## 【0011】

これらのダイオキシン類の中でも、1分子中に塩素原子を4個以上有する多塩素化物が特に人体に対する毒性が高く、そのような化合物としては、例えば、2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾー

-

ジオキシン、1, 2, 3, 7, 8-ペンタクロロジベンゾー

-

ジオキシン、1, 2, 3, 4, 7, 8-ヘキサクロロジベンゾー

-

ジオキシン、1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-ヘプタクロロジベンゾー

-

ジオキシン、1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9-オクタクロロジベンゾー

-

ジオキシンなどのジベンゾー

-

ダイオキシンの多塩素化物；2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾフラン、1, 2, 3, 7, 8-ペンタクロロジベンゾフラン、2, 3, 4, 7, 8-ペンタクロロジベンゾフラン、1, 2, 3, 4, 7, 8-ヘキサクロロジベンゾフラン、1, 2, 3, 6, 7, 8-ヘキサクロロジベンゾフラン、1, 2, 3, 7, 8, 9-ヘキサクロロジベンゾフラン、2, 3, 4, 6, 7, 8-ヘキサクロロジベンゾフラン、1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-ヘプタクロロジベンゾフラン、1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9-オクタクロロジベンゾフランなどのジベンゾフランの多塩素化物がある。

## 【0012】

また、コプラナ（C o p l a n a r）PCBとしては、3, 3', 4, 4' -

テトラクロロビフェノール、3, 3', 4, 4', 5-ペンタクロロビフェノール、3, 3', 4, 4', 5, 5'-ヘキサクロロビフェノールなどの化合物が挙げられる。上記塩素化物の中でも、最も毒性の高い化合物は、2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾ-p-ジオキシンである。

更に、ビスフェノール類としては、2, 2-ビス(4-ヒドロキシフェニル)プロパンや1, 1-ビス(4-ヒドロキシフェニル)シクロヘキサンなどの化合物が挙げられる。これらの化合物のうち、本発明の方法に適するものとしては、2, 2-ビス(4-ヒドロキシフェニル)プロパンが挙げられる。

アルキルフェノール類としては、ノニルフェノール、ペンチルフェノール、ターシャルブチルフェノールなどの化合物が挙げられる。

#### 【0013】

また、ハロゲン化フェノール類としては、ジクロロフェノール、トリクロロフェノール、テトラクロロフェノール、ペンタクロロフェノールなどの化合物が挙げられる。

更に、フタル酸エステル類としては、ジブチルフタレート、ブチルベンジルフタレート、ジ-2-エチルヘキシルフタレートなどの化合物が挙げられる。

#### 【0014】

上記難分解性芳香族化合物の分解に用いるラッカーゼまたはラッカーゼを生産する微生物としては、ラッカーゼ生産性の高い微生物、例えば、シゾフィラム(*Schizophyllum*) 属、プレウロタス(*Pleurotus*) 属、トラメテス(*Trametes*) 属、レンチナス(*Lentinus*) 属、リゾクトニア(*Rhizoctonia*) 属、フナリア(*Funalia*) 属、フィクノポラス(*Pycnoporus*) 属、メルリウス(*Merulius*) 属、ミセリオプトラ(*Myceliophthora*) 属、コプリヌス(*Coprinus*) 属、アガリクス(*Agaricus*) 属、フォリオタ(*Pholiota*) 属、フラムリナ(*Flammulina*) 属、ガノデルマ(*Ganoderma*) 属、ダエダレオプシス(*Daedaleopsis*) 属、ファボラス(*Favolus*) 属、リオフィラム(*Lyophyllum*) 属またはオーリクラリア(*Auricularia*) 属に属する微生物を用いることができる。この場合

、微生物そのものを用いてもよいし、これら菌体が生産したラッカーゼをイオン交換樹脂による分離法などにより培養液から分離して用いてもよい。

## 【 0 0 1 5 】

上記微生物が生産したラッカーゼには、ラッカーゼとともにリグニンペルオキシダーゼ、マンガンペルオキシダーゼ等を併産してなるものも含み、従って、本発明に用いるラッカーゼとしては、これにリグニンペルオキシダーゼ、マンガンペルオキシダーゼ等が混在したものも用いることができる。

さらに、本発明においては、ラッカーゼを生産する微生物の生菌体と、これら菌体の培養液から分離したラッカーゼとの混合物を用いることもできる。本発明は、これらいずれを用いても実施することができるが、ラッカーゼの活性を長期にわたって維持できるという点において、微生物の生菌体を用いる方法が最も効果的である。

## 【 0 0 1 6 】

上記菌体の培養液から分離したラッカーゼを用いる場合には、このラッカーゼの活性を最大限発揮させるためにメディエーターを添加することが好ましい。該メディエーターとしては、例えば、1-ヒドロキシベンゾトリアゾールなどのフェノール性化合物や、2, 2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)などのアニリン系化合物やエトキシ脂肪酸エステル類が好適に用いられる。

上記の微生物を培養する方法については、通常の微生物の培養方法と同様に行うことができ、例えば、ポテトデキストロース液体培地、オートミール液体培地、あるいはふすま、米ぬか、木材チップ、大麦、イナワラ等を混合した固体培地を用いて行うことができる。実験室的には、ポテトデキストロース培地で5日間、20～40℃で培養するなどの方法によることができる。また、大量に培養する場合には、通常のタンクによる液体培養によるのが好ましいが、小麦全粒などの植物由来の固体成分や糖、窒素、リン、ミネラルなどを含浸させた無機多孔質担体などを用いた固体培養による方法を採用することもできる。

## 【 0 0 1 7 】

上記の微生物の培養においては、得られる培養物の菌濃度が、植物性有機物乾

乾燥重量 1 g あたり、 $1 \times 10^2$  cfu (コロニー形成単位) 以上、好ましくは  $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{10}$  cfu、より好ましくは  $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^7$  cfu の範囲とする。上記濃度未満であると、ダイオキシン類等を含む水や土壌に菌を接種した際に、菌の繁殖の遅れを招くおそれがある他、既に存在する菌に対して接種した菌が優先的に繁殖することが困難になることがある。

また、これら菌の培養に際しては、菌糸体、孢子のいずれも使用できるが、通常は、培養が容易な菌糸体を用いる。

#### 【0018】

このようにして得られた上記微生物やその生産物であるラッカーゼを用いて前記難分解性化合物を分解する接触反応は、その反応温度を  $10 \sim 85^\circ\text{C}$ 、好ましくは  $20 \sim 80^\circ\text{C}$  として行うことが好ましい。この反応温度が  $10^\circ\text{C}$  未満であると、水や土壌中での菌の増殖が遅く、またラッカーゼの反応も遅くなり、反応温度が  $85^\circ\text{C}$  を超えると、酵素が失活しやすくなることがある。

また、上記反応を行う際、上記難分解性芳香族化合物をラッカーゼまたはラッカーゼを生産する微生物と、水または土壌中で接触させることが好ましいが、上記難分解性化合物を含む水または土壌の pH は、 $3 \sim 11$  の範囲であることが好ましく、 $3.5 \sim 10.5$  の範囲に調整するのがより好ましい。上記 pH が 3 未満であると、ラッカーゼの反応が遅く、また、pH が 11 を超えてもラッカーゼの反応が遅く、ラッカーゼが失活しやすくなる。したがって、水または土壌の pH が  $3 \sim 11$  の範囲を外れている場合には、無機または有機の酸やアルカリ物質を添加してその pH を調整し、ラッカーゼの反応を円滑に進行させるようにするのが好ましい。

#### 【0019】

難分解性芳香族化合物を分解する上記接触反応の際、微生物またはラッカーゼの他に、銅化合物を添加してもよい。添加する銅化合物としては、例えば、硫酸銅や塩化銅などが好適に用いられる。上記銅化合物の添加量は、難分解性芳香族化合物を含む水または土壌に対して、 $0.01 \sim 1$  ミリモル濃度となるようにすることが好ましく、これら銅化合物の添加により、ラッカーゼの生産性や安定性がより良好になる。

【0020】

【実施例】

以下に、実施例により、本発明をさらに具体的に説明する。

〔実施例 1〕

(1) ラッカーゼ生産微生物の培養

内容積 250 ミリリットルのマイヤーフラスコに、ポテトデキストロース 24 g を 1 リットルの水道水に溶解させて調製した液体培地 50 ミリリットルを注入し、シリコ栓により密栓した後、121℃で20分間殺菌処理した。

つぎに、このマイヤーフラスコを室温まで冷却し、ラッカーゼ生産微生物として、シゾフィラム・コムネ [Schizophillum commune; IFO 6505] を、1 白金耳植種した。ついで、このラッカーゼ生産微生物を接種した培養液を、28℃において14日間にわたり静置培養した。

【0021】

(2) ラッカーゼ活性の測定

pH 値を 4.5 に調整したマロン酸緩衝液 100 ミリモルを含有する溶液に、上記 (1) で得られた培養液を加えた。ついで、これに 4-アミノアンチピリン 2 ミリモルと、フェノール 1 ミリモルを加え、30℃において反応させた。

この反応の終了後、波長 500 nm の光についての吸光度を測定し、この反応前の溶液の吸光度からの変化によりラッカーゼ活性を求めた。

このラッカーゼ活性の値は、1 cm 光路長において 1 分間に吸光度を 1 増加させる酵素量を、1 ユニットとして算出した。この結果、上記 (1) において得られた培養物のラッカーゼ活性は、7.5 ユニット/g 乾物であった。

【0022】

(3) ダイオキシン類の分解反応

内容積 250 ミリリットルのマイヤーフラスコに、ポテトデキストロース 24 g を 1 リットルの水道水に溶解させて調製した液体培地 50 ミリリットルを注入した。

ついで、この培地に、ダイオキシン類として、2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾダイオキシン、および 2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾフランを

、それぞれ  $100 \mu\text{g} / 2.4$  ミリリットルの濃度で含むノナン溶液を等量混合した溶液  $0.24$  ミリリットルを加え、さらに、界面活性剤としてポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート〔花王アトラス社製：Tween 80〕を  $100 \mu\text{g}$  加えてシリコ栓で密栓した後  $121^\circ\text{C}$  で  $20$  分間殺菌した。

## 【0023】

つぎに、この培地に、ラッカーゼ生産微生物として、シゾフィラム・コムネ〔*Schizophillum commune*; IFO-6505〕を、 $1$  白金耳接種した。ついで、このラッカーゼ生産微生物を接種した培養液を、 $2$  日に  $1$  回の頻度でゆっくり攪拌しながら、 $28^\circ\text{C}$  で  $20$  日間にわたり静置培養した。

培養終了後、トルエン  $50$  ミリリットルを加えて、ラッカーゼによるダイオキシン類の分解反応を停止させ、ついで、ここで得られた  $2$  種のダイオキシン類を抽出し、GC-MSにより定量した。

## 【0024】

また、比較のため、ラッカーゼ生産微生物を無添加で上記と同様の操作を行い、その場合のダイオキシンの残存量を  $100$  として、式、

$$\left[ (\text{微生物無添加時の残存ダイオキシン量} - \text{微生物添加時の残存ダイオキシン量}) / \text{微生物無添加時の残存ダイオキシン量} \right] \times 100 (\%)$$

により、上記シゾフィラム・コムネによるダイオキシン類の分解率を算出したところ、 $2, 3, 7, 8$ -テトラクロロジベンゾダイオキシンに対する分解率は、 $72\%$  であり、 $2, 3, 7, 8$ -テトラクロロジベンゾフランに対する分解率は  $81\%$  であった。

## 【0025】

## 〔実施例 2〕

## (1) ラッカーゼ生産微生物の培養

ラッカーゼ生産微生物として、トラメテス・ベルシカラー〔*Trametes versicolor*; IFO-4941〕を用いた他は、実施例 1 の (1) と同様に行った。

## (2) ラッカーゼ活性の測定

上記 (1) で得られた培養液を用いた他は、実施例 1 の (2) と同様にしてラ

ッカーゼ活性を求めた。この結果、上記（１）において得られた培養物のラッカーゼ活性は、12.4 ユニット／g 乾物であった。

【0026】

（３）ダイオキシン類の分解反応

ラッカーゼ生産微生物として、トラメテス・ベルシカラー [Trametes versicolor; IFO-4941] を用いた他は、実施例 1 の（３）

と同様にした。

この結果、上記トラメテス・ベルシカラーによる 2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾダイオキシンに対する分解率は 78% であり、また 2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾフランに対する分解率は 88% であった。

【0027】

〔実施例 3〕

（１）ラッカーゼ生産微生物の培養

ラッカーゼ生産微生物として、トラメテス・ベルシカラー [Trametes versicolor; IFO-9791] を用いた他は、実施例 1 の（１）

と同様にした。

（２）ラッカーゼ活性の測定

上記（１）で得られた培養液を用いた他は、実施例 1 の（２）と同様にしてラッカーゼ活性を求めた。この結果、上記（１）において得られた培養物のラッカーゼ活性は、10.2 ユニット／g 乾物であった。

【0028】

（３）ダイオキシン類の分解反応

ラッカーゼ生産微生物として、トラメテス・ベルシカラー [Trametes versicolor; IFO-9791] を用いた他は、実施例 1 の（３）

と同様にした。

この結果、上記トラメテス・ベルシカラーによる 2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾダイオキシンに対する分解率は 79% であり、また 2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾフランに対する分解率は 86% であった。

【0029】



〔実施例 4〕

(1) ラッカーゼ生産微生物の培養

ラッカーゼ生産微生物として、トラメテス・ベルシカラー〔*Trametes versicolor*; IFO-30340〕を用いた他は、実施例 1 の (1) と同様にした。

(2) ラッカーゼ活性の測定

上記 (1) で得られた培養液を用いた他は、実施例 1 の (2) と同様にしてラッカーゼ活性を求めた。この結果、上記 (1) において得られた培養物のラッカーゼ活性は、13.9 ユニット/g 乾物であった。

【0030】

(3) ダイオキシン類の分解反応

ラッカーゼ生産微生物として、トラメテス・ベルシカラー〔*Trametes versicolor*; IFO-30340〕を用いた他は、実施例 1 の (3) と同様にした。

この結果、上記トラメテス・ベルシカラーによる 2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾダイオキシンに対する分解率は 82% であり、また 2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾフランに対する分解率は 91% であった。

【0031】

〔実施例 5〕

(1) ラッカーゼ生産微生物の培養

ラッカーゼ生産微生物として、トラメテス・ベルシカラー〔*Trametes versicolor*; IFO-30388〕を用いた他は、実施例 1 の (1) と同様にした。

(2) ラッカーゼ活性の測定

上記 (1) で得られた培養液を用いた他は、実施例 1 の (2) と同様にしてラッカーゼ活性を求めた。この結果、上記 (1) において得られた培養物のラッカーゼ活性は、9.2 ユニット/g 乾物であった。

【0032】

(3) ダイオキシン類の分解反応

ラッカーゼ生産微生物として、トラメテス・ベルシカラー〔*Trametes versicolor*; IFO-30388〕を用いた他は、実施例1の(3)と同様にした。

この結果、上記トラメテス・ベルシカラーによる2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾダイオキシンに対する分解率は74%であり、また2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾフランに対する分解率は79%であった。

#### 【0033】

##### 〔実施例6〕

##### (1) ラッカーゼ生産微生物の培養

ラッカーゼ生産微生物として、プレウロタス・パルモナリス〔*Pleurotus pulmonaris*; IFO-31345〕を用いた他は、実施例1の(1)と同様にした。

##### (2) ラッカーゼ活性の測定

上記(1)で得られた培養液を用いた他は、実施例1の(2)と同様にしてラッカーゼ活性を求めた。この結果、上記(1)において得られた培養物のラッカーゼ活性は、9.2ユニット/g乾物であった。

#### 【0034】

##### (3) ダイオキシン類の分解反応

ラッカーゼ生産微生物として、プレウロタス・パルモナリス〔*Pleurotus pulmonaris*; IFO-31345〕を用いた他は、実施例1の(3)と同様にした。

この結果、上記プレウロタス・パルモナリスによる2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾダイオキシンに対する分解率は68%であり、また2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾフランに対する分解率は77%であった。

これら実施例1～6の結果をまとめて第1表に示す。

#### 【0035】

【表 1】

第 1 表

実施例	微生物の種類	ラッカーゼ活性 (u/g乾物)	2,3,7,8-テトラ クロロジベンゾ ダイオキシン分 解率 (%)	2,3,7,8-テトラ クロロジベンゾ フラン分解率 (%)
1	シゾフィラム・コムネ (IFO 6505)	7.5	72	81
2	トラメテス・ベル シカラー (IFO 4941)	12.4	78	88
3	トラメテス・ベル シカラー (IFO 9791)	10.2	79	86
4	トラメテス・ベル シカラー (IFO 30340)	13.9	82	91
5	トラメテス・ベル シカラー (IFO 30388)	9.2	74	79
6	ブレロタス・パル モナリス (IFO 31345)	9.2	68	77

【0036】

〔実施例 7～10〕

内容積 500 ミリリットルのマイヤーフラスコに、100 ミリリットルのオートミール培地を注入し、シリコ栓により密栓した後、121℃で20分間殺菌処理した。

つぎに、このマイヤーフラスコを室温まで冷却し、ラッカーゼ生産微生物として、フィクノポラス・コッシネウス〔*Pynoporus coccineus* ; IFO-4923〕を、1 白金耳植種した。ついで、このラッカーゼ生産微生物を接種した培養液を、27℃において1週間静置培養した。

## 【0037】

ついで、この培地に、難分解性物質として、アセトンに溶解した、2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾダイオキシシ 1ミリリットル (5 ng 含有) (実施例7)、3, 3', 4, 4', 5, 5'-コプラナPCB 1ミリリットル (5 ng 含有) (実施例8)、ビスフェノールA 1ミリリットル (50  $\mu$ g 含有) (実施例9)、またはペンタクロロフェノール (実施例10) 1ミリリットル (1 mg 含有) (いずれも pH 7.5) を添加し、3分間激しく攪拌した後、再び27℃で1週間静置培養した。

ついで、その全量を抽出し、GC-MSにより定量した。

## 【0038】

また、比較のため、ラッカーゼ生産微生物を無添加で上記の操作を行い、その場合のダイオキシシンの残存量を100として、実施例1と同様にしてダイオキシシンの分解率を算出したところ、2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾダイオキシシに対する分解率は92%であり、3, 3', 4, 4', 5, 5'-コプラナPCBに対する分解率は76%であり、ビスフェノールAに対する分解率は96%であり、また、ペンタクロロフェノールに対する分解率は84%であった。

## 【0039】

## 〔実施例11～14〕

ラッカーゼ生産微生物として、リゾクトニア・プラティコラ [*Rhizoctonia praticola*; ATCC-16129] を用いた他は、実施例7と同様にしてラッカーゼ生産微生物を培養し、難分解性物質の分解率を測定したところ、2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾダイオキシシに対する分解率は96%であり、3, 3', 4, 4', 5, 5'-コプラナPCBに対する分解率は86%であり、ビスフェノールAに対する分解率は97%であり、また、ペンタクロロフェノールに対する分解率は75%であった。

## 【0040】

## 〔実施例15～18〕

ラッカーゼ生産微生物として、レンチナス・エドデス [*Lentinus edodes*; IFO-31864] を用いた他は、実施例7と同様にしてラッカ

ーゼ生産微生物を培養し、難分解性物質の分解率を測定したところ、2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾダイオキシンに対する分解率は72%であり、3, 3', 4, 4', 5, 5'-コプラナPCBに対する分解率は78%であり、ビスフェノールAに対する分解率は92%であり、また、ペンタクロロフェノールに対する分解率は87%であった。

【0041】

〔実施例19～22〕

ラッカーゼ生産微生物として、メルリウス・トレメロータス [*Merulius tremellosus*; IFO-30385] を用いた他は、実施例7と同様にしてラッカーゼ生産微生物を培養し、難分解性物質の分解率を測定したところ、2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾダイオキシンに対する分解率は77%であり、3, 3', 4, 4', 5, 5'-コプラナPCBに対する分解率は68%であり、ビスフェノールAに対する分解率は94%であり、また、ペンタクロロフェノールに対する分解率は86%であった。

つぎに、これら実施例7～22の結果をまとめて第2表に示す。

【0042】

【表 2】

第 2 表

実施例	微生物の種類	難分解性物質の種類	分解率 (%)
7	フィクノボラス・	2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾダイオキシン	92
8	シンナバリナス	3, 3', 4, 4', 5, 5' - コプラPCB	76
9	(IFO 4923)	ビスフェノール A	96
10		ペンタクロロフェノール	84
11	リソクトニア・ブ	2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾダイオキシン	96
12	ラティコラ	3, 3', 4, 4', 5, 5' - コプラPCB	86
13	(ATCC 16129)	ビスフェノール A	97
14		ペンタクロロフェノール	75
15	レンチナス・エド	2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾダイオキシン	72
16	デス	3, 3', 4, 4', 5, 5' - コプラPCB	78
17	(IFO 31864)	ビスフェノール A	92
18		ペンタクロロフェノール	87
19	メルリウス・トレ	2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾダイオキシン	77
20	メロータス	3, 3', 4, 4', 5, 5' - コプラPCB	68
21	(IFO 30385)	ビスフェノール A	94
22		ペンタクロロフェノール	86

【0043】

【実施例 23】

## (1) ラッカーゼ酵素液の調製

内容積 500 ミリリットルのマイヤーフラスコ 5 本に、それぞれ培地成分として、フスマ 1.5 g と、米ぬか 1.5 g, クヌギおが屑 0.58 g、硫酸銅・5 水和物 0.5 mg を入れ、さらに水道水 100 ミリリットルを加えた。

ついで、これらフラスコに密栓をしてオートクレーブに入れ、121℃の温度において20分間殺菌した。

つぎに、この培地を室温に冷却した後、上記フラスコ 5 本にそれぞれラッカーゼ生産微生物として、シゾフィラム・コムネ [Schizophillum commune; IFO-6505] を1白金耳接種し、温度25℃、回転数110 rpmにおいて、3日間にわたり振とう培養をした。その後、温度25℃において7日間にわたり、静置培養した。

【0044】

培養終了後、これら5本のフラスコ内の培養物を集め、11,000 Gにおい

て遠心分離することにより、上澄み液を得た。この上澄み液のラッカーゼ活性は、12.0 ユニット/g であり、リグニンパーオキシダーゼおよびマンガンパーオキシダーゼの活性は認められなかった。

ついで、得られた上澄み液に、その腐敗防止のために、10 w/v % 濃度の塩化ベンザルコニウム液〔日本製薬社製〕を1.0 ミリリットル加え、さらに水道水を加えて全量を500 ミリリットルとして、ラッカーゼ酵素液を調製した。

【0045】

### (2) ダイオキシシン類含有水の調製

流動床式の焼却炉から採取したダイオキシシン類を含む都市ゴミ焼却灰200 g に、2 規定濃度の塩酸1 リットルを加えて、2 時間放置した。

ついで、この液を吸引濾過して得た上澄み液に、ジクロルメタン1 リットルを加え、室温において2 時間にわたり液-液抽出をした。また、吸引濾過で得られた焼却灰に、トルエン1 リットルを加え、室温において、攪拌下に48 時間にわたって抽出した。

つぎに、上記ジクロルメタン抽出液とトルエン抽出液を混合して、これを無水硫酸ナトリウムにより脱水した後、減圧濃縮乾固した。さらに、この濃縮乾固物に、界面活性剤としてポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート〔花王アトラス社製：Tween 80〕を5 ミリリットルを加え、ついで水道水1 リットルを加えて混合し、ダイオキシシン類を含有する水を調製した。

【0046】

### (3) ダイオキシシン類の分解反応

内容積250 ミリリットルのマイヤーフラスコに、上記(2)で調製したダイオキシシン類を含有する水25 ミリリットルを入れ、1 規定濃度の塩酸を加えて、ダイオキシシン類含有水のpHを3.5に調整した。

つぎに、このダイオキシシン類含有水に、上記(1)で調製したラッカーゼ酵素液25 ミリリットルを加え、50℃で3 時間攪拌して、ダイオキシシン類のラッカーゼ酵素による分解反応を行った。

反応終了後、ジクロルメタンを加えて反応を完全に停止させ、反応液中に残存するダイオキシシン類の量を測定して、ダイオキシシン類の分解率を算出した。

ここでの、ダイオキシン類の分解率の算出には、比較のために pH を 7. 0 とし、かつラッカーゼ酵素無添加の場合のダイオキシン類の含有量を 1 0 0 として、次式により算出した。

$$[(\text{酵素無添加試料} - \text{酵素添加試料}) / \text{酵素無添加試料}] \times 100 (\%)$$

この結果、この反応におけるダイオキシン類の分解率は 3 8 % であった。

【 0 0 4 7 】

〔実施例 2 4 ～ 2 8〕

実施例 2 3 の ( 3 ) におけるダイオキシン類含有水の pH を、順次、4. 5 [ 実施例 2 4 ]、5. 5 [ 実施例 2 5 ]、7. 0 [ 実施例 2 6 ]、9. 0 [ 実施例 2 7 ]、1 0. 0 [ 実施例 2 8 ] に調整した他は、実施例 2 3 の ( 3 ) と同様にして、ダイオキシン類のラッカーゼ酵素による分解反応を行った。なお、実施例 2 7 および 2 8 においては、1 規定濃度の水酸化ナトリウムを加えてダイオキシン類含有水の pH の調整をした。

これら結果を、実施例 2 3 も含めて第 3 表に示す。

【 0 0 4 8 】



【表 3】

第 3 表

実施例	微生物の種類	反応液のpH	ダイオキシンの分解率 (%)
23	シゾフィラム・コムネ (IFO 6505)	3.5	38
24	シゾフィラム・コムネ (IFO 6505)	4.5	74
25	シゾフィラム・コムネ (IFO 6505)	5.5	76
26	シゾフィラム・コムネ (IFO 6505)	7.0	72
27	シゾフィラム・コムネ (IFO 6505)	9.0	58
28	シゾフィラム・コムネ (IFO 6505)	10.0	41

【0049】

〔実施例29～34〕

ラッカーゼ生産微生物として、トラメテス・ベルシカラー [Trametes versicolor; IFO-30340] を用いた他は、実施例23の(1)と同様にして、ラッカーゼ酵素液を調製した。

ついで、実施例23の(2)と同様にして調製したダイオキシン類含有水を使用し、これを1規定濃度の塩酸または1規定濃度の水酸化ナトリウムにより、そのpHを順次、3.5〔実施例29〕、5.0〔実施例30〕、6.0〔実施例31〕、7.0〔実施例32〕、8.5〔実施例33〕、9.5〔実施例34〕に調整した他は、実施例23の(3)と同様にして、ダイオキシン類のラッカーゼ酵素による分解反応を行った。

これら結果を、第4表に示す。

【0050】

【表 4】

第 4 表

実施例	微生物の種類	反応液のpH	ダイオキシンの分解率 (%)
29	トラメテス・ベルシカ ラー (IFO 30340)	3.5	42
30	トラメテス・ベルシカ ラー (IFO 30340)	5.0	78
31	トラメテス・ベルシカ ラー (IFO 30340)	6.0	82
32	トラメテス・ベルシカ ラー (IFO 30340)	7.0	69
33	トラメテス・ベルシカ ラー (IFO 30340)	8.5	62
34	トラメテス・ベルシカ ラー (IFO 30340)	9.5	60

【0051】

【実施例35～40】

ラッカーゼ生産微生物として、プレウロタス・パルモナリス [Pleurotus pulmonaris; IFO-31345] を用いた他は、実施例23の(1)と同様にして、ラッカーゼ酵素液を調製した。

ついで、実施例23の(2)と同様にして調製したダイオキシン類含有水を使用し、これを1規定濃度の塩酸または1規定濃度の水酸化ナトリウムにより、そのpHを順次、3.5 [実施例35]、5.0 [実施例36]、7.0 [実施例37]、8.0 [実施例38]、9.0 [実施例39]、10.0 [実施例40] に調整した他は、実施例23の(3)と同様にして、ダイオキシン類のラッカーゼ酵素による分解反応を行った。

これら結果を第5表に示す。

【0052】

【表 5】

第 5 表

実施例	微生物の種類	反応液のpH	ダイオキシンの 分解率 (%)
35	ブレロタス・バルモナ リス (IFO 31345)	3.5	35
36	ブレロタス・バルモナ リス (IFO 31345)	5.0	78
37	ブレロタス・バルモナ リス (IFO 31345)	7.0	72
38	ブレロタス・バルモナ リス (IFO 31345)	8.0	64
39	ブレロタス・バルモナ リス (IFO 31345)	9.0	58
40	ブレロタス・バルモナ リス (IFO 31345)	10.0	46

【0053】

## 【発明の効果】

本発明によれば、都市ゴミや産業廃棄物などの焼却に伴って発生するダイオキシン類、コプラナPCB類、ビスフェノール類、アルキルフェノール類、ハロゲン化フェノール類、フタル酸エステル類などの有害な難分解性芳香族化合物を、酵素生産の安定性に優れたラッカーゼ生産微生物または該微生物が生産したラッカーゼにより効果的に分解させて無害化することができる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 有害なダイオキシン類やコプラナPCB類等の難分解性芳香族化合物を、酵素生産の安定性に優れた微生物により効率よく分解して無害化することのできる方法を提供する。

【解決手段】 ~~ダイオキシン類、コプラナPCB類、ビスフェノール類、アルキルフェノール類、ハロゲン化フェノール類及びフタル酸エステル類などの炭素数が6以上の難分解性芳香族化合物を分解するにあたり、該難分解性芳香族化合物と、ラッカーゼおよび／またはラッカーゼを生産する微生物とを接触させることを特徴とする難分解性芳香族化合物の分解方法。~~

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書  
【提出日】 平成12年 8月18日  
【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願2000-208788

【補正をする者】

【識別番号】 000183646

【氏名又は名称】 出光興産株式会社

【代理人】

【識別番号】 100078732

【弁理士】

【氏名又は名称】 大谷 保

【発送番号】 049567

【手数料補正】

【補正対象書類名】 特許願

【予納台帳番号】 003171

【納付金額】 21,000円

【ブルーフの要否】 要

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000183646]

---

1. 変更年月日	1990年 8月 8日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区丸の内3丁目1番1号
氏 名	出光興産株式会社